

Рекомендации по настройке амплификатора BIO-RAD для работы с наборами реагентов для определения статуса мутаций гена NRAS, гена KRAS, гена EGFR, гена BRAF методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-NRAS-ткань, Тест-KRAS-ткань, Тест-EGFR-ткань, Тест-BRAF-ткань) производства ООО «ТестГен».

При работе с набором реагентов Тест-NRAS-ткань на амплификаторах производителя BIO-RAD после завершения реакции часто требуется ручная коррекция базовой линии, чтобы не получились вот такие волнообразные кривые (Рис. 1,2):

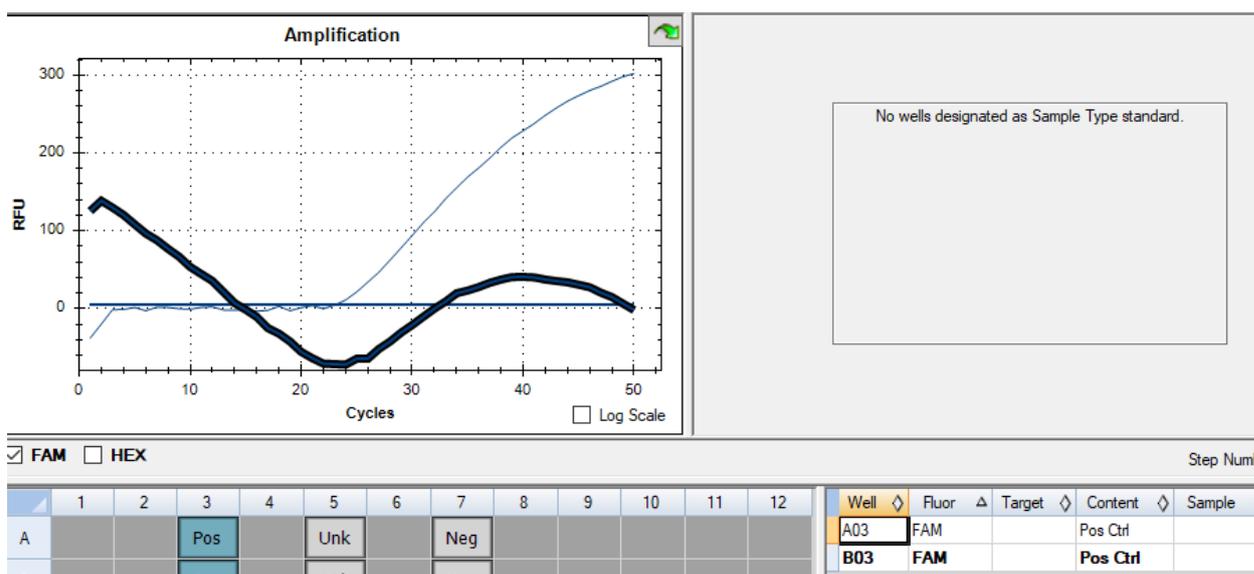


Рис. 1

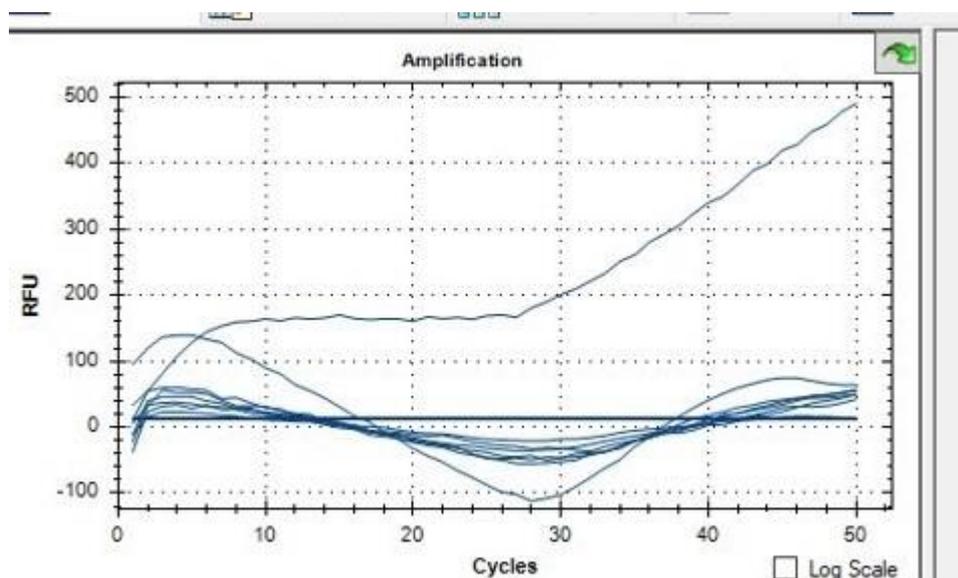


Рис. 2

Чтобы получить правильный результат, эти графики необходимо обработать. Для этого нужно выбрать один краситель (FAM или HEX) (Рис. 3):



Рис. 3

Затем правой кнопкой выбрать настройки базовой линии (Рис. 4,5):

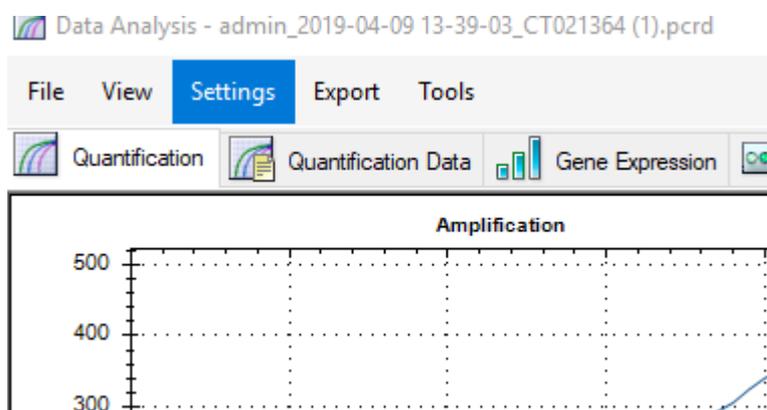


Рис. 4

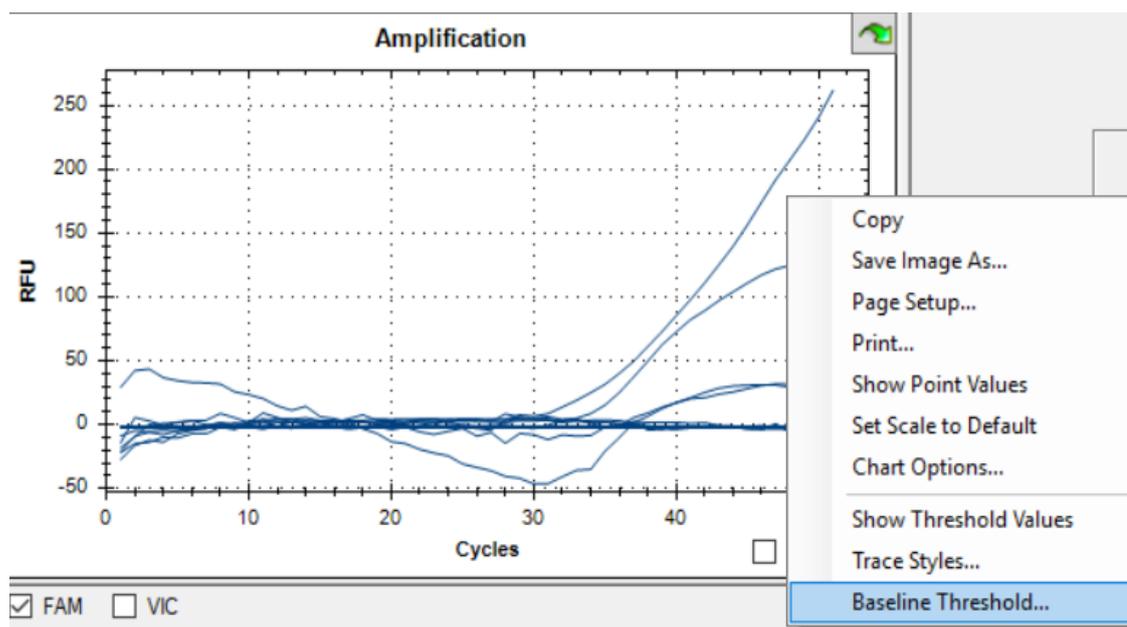


Рис. 5

С помощью визуального подбора для всех ячеек установить начальный и конечный циклы, при которых кривые будут выглядеть нормально (Рис. 6).

Baseline Threshold

Baseline Cycles

Auto Calculated

User Defined **Bold** indicates a changed value.

	Well	Fluor	Baseline Begin	Baseline End
1	A01	FAM	5	50
2	A02	FAM	5	31
3	A03	FAM	5	11
4	A04	FAM	5	50
5	A05	FAM	5	31
6	A06	FAM	5	50
7	A07	FAM	5	50
8	A08	FAM	5	50

All Selected Rows Begin: 5 End: 25

Reset All User Defined Values

Single Threshold

Auto Calculated: -1,69

User Defined: -1,69

OK Cancel

Рис. 6

Обычно это примерные интервалы 3-15 или 5-20 или 10-25. Нужен наиболее линейный участок - это тот фрагмент графика, по которому программное обеспечение прибора расположит кривые правильно. Когда имеется ошибка в определении этого интервала (обычно при автоматической интерпретации), мы и видим ошибки отображения (Рис. 7).

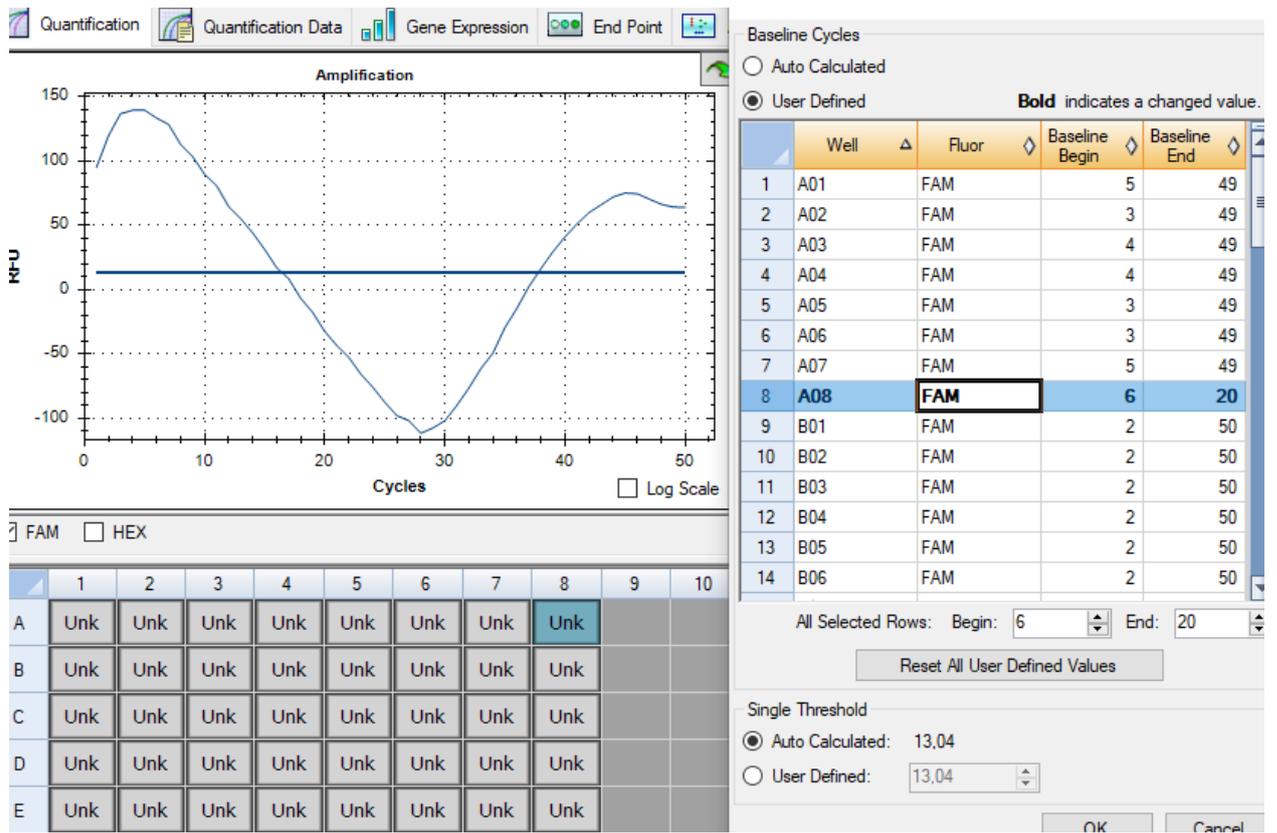


Рис. 7

Вот что выходит после такой обработки кривой (Рис. 8):

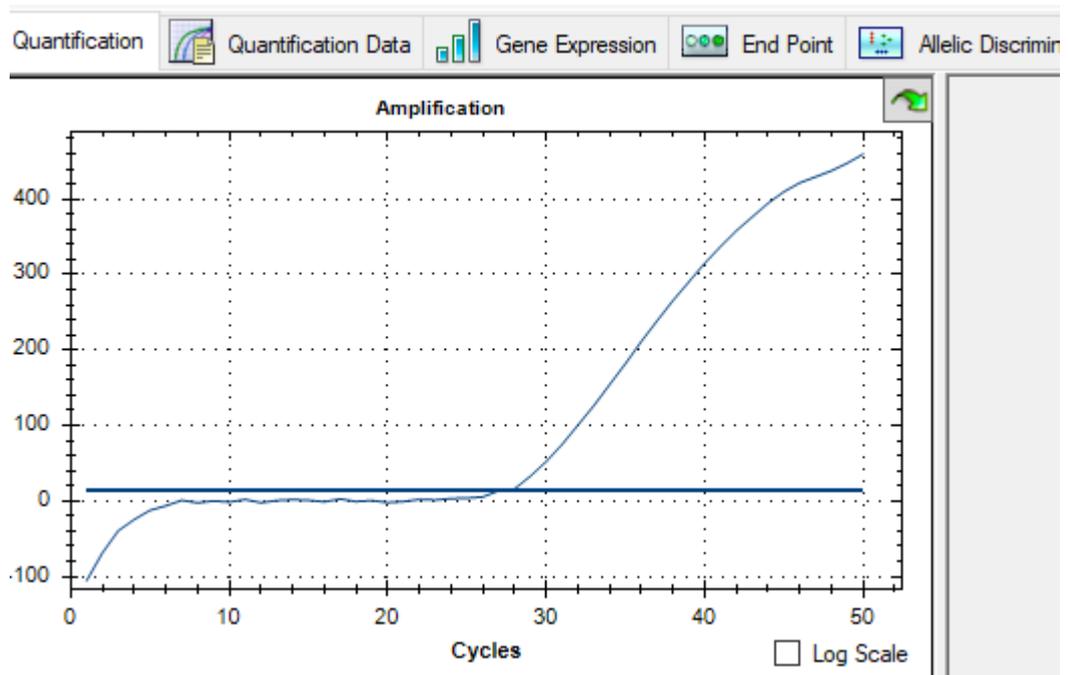


Рис. 8

Картина получается совсем другая, нет никаких "провалов" под базовую линию. Амплификатор по графикам будет высчитывать верные C_q .

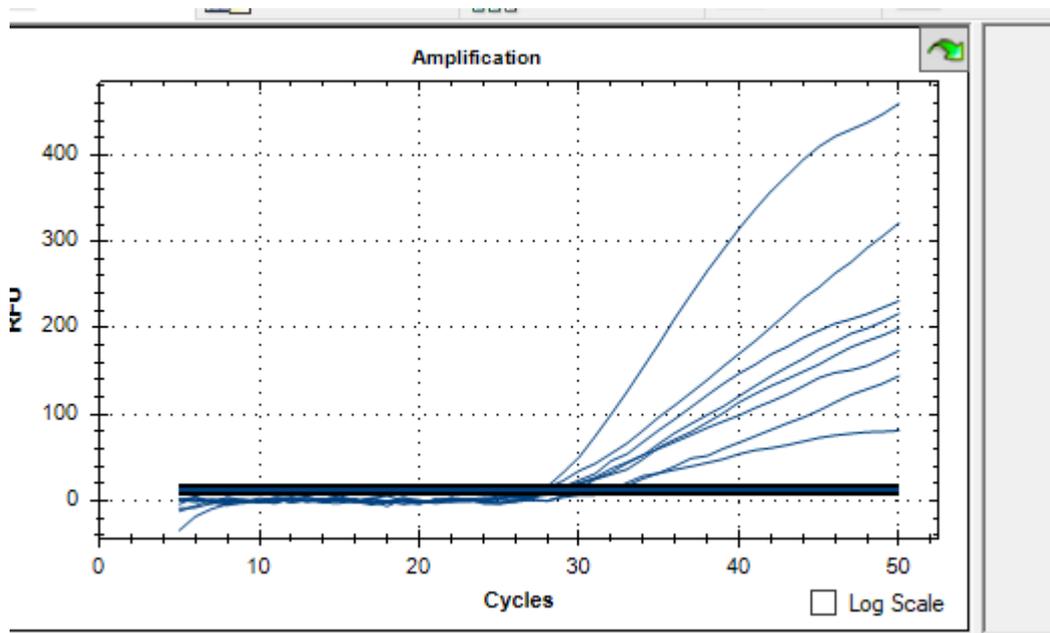


Рис. 9

Такой же принцип настройки прибора применяется и для наборов **Тест-KRAS-ткань**, **Тест-EGFR-ткань**, **Тест-BRAF-ткань**.